# Optimización de un método de separación y validación de la cuantificación de β-Cariofileno presente en flores, hojas y tallos de la especie *Achillea millefolium* (milenrama) por cromatografía de gases (CG-FID)

**Juan Gómez Bulla [1], Jocksan Guerrero López [2] y Sofía Parra Tinoco [3]**

[1] Universidad El Bosque; jggomez@unbosque.edu.co
[2] Universidad El Bosque; jdguerrerol@unbosque.edu.co
[3] Universidad El Bosque; kparrat@unbosque.edu.co

**Resumen:** La *Achillea millefolium* (milenrama) es una de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo, se atribuye su potencial farmacológico principalmente al metabolito β-Cariofileno. Sin embargo, no existe una validación que cuantifique el β-Cariofileno presente en esta planta. Por esta razón, en este documento se describe la validación del método de cuantificación de β-Cariofileno en flores, hojas y tallos de la milenrama haciendo uso de cromatografía de gases adaptado a un detector FID. La extracción del aceite esencial se realizó en etanol asistido por sonda ultrasónica, donde se construyó una curva de calibración por el método de adición estándar. Dicha curva de calibración presenta una regresión lineal en flores (0,999), hojas (0,981) y tallos (0,999) lo que indica una buena relación entre la concentración y las señales del analito. Con esta información se encontraron las condiciones cromatográficas necesarias para separar y cuantificar el β-Cariofileno para posteriormente validar el método por medio de linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación. Donde se encontró que la concentración de β-Cariofileno en flores, hojas y tallos fue de 6,189 ppm, 4,670 ppm y 5,452 ppm respectivamente. De esta manera, se concluyó que la parte con mayor concentración de β-Cariofileno fueron las flores.

**Palabras clave:** β-Cariofileno; *Achillea millefolium*; cuantificación; validación; cromatografía de gases; curva de calibración.

## 1. Introducción

Las amenazas a la salud humana están en constante aumento y los medicamentos de síntesis química han demostrado una disminución en su efectividad junto a una serie de efectos secundarios que obliga a las personas a buscar una alternativa [1]. Es aquí donde la medicina herbaria toma un papel fundamental, pues el uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades tiene una larga historia, esto se debe a que el ser humano ha estado en una constante búsqueda de tratamientos innovadores haciendo uso de compuestos extraídos de la naturaleza, especialmente aquellos que se derivan de plantas, ya que han demostrado ser valiosas fuentes de compuestos terapéuticos [1,2].

Dentro de estas plantas medicinales destaca la *Achillea millefolium* o milenrama pues es una de las plantas medicinales más utilizadas en el mundo, principalmente para tratar heridas, problemas digestivos, infecciones respiratorias y afecciones de la piel, y, en segundo lugar, entre otros usos, para enfermedades hepáticas y como sedante suave [1-3]. En Colombia se comercializan algunos productos fitoterapéuticos a base de la milenrama, que han sido aprobados y registrados ante el INVIMA como productos fitoterapéuticos de uso tradicional coadyuvante de uso interno en procesos inflamatorios y en trastornos digestivos y estimulantes del apetito. Sin embargo, se han realizado estudios donde se ha

encontrado además actividad de tipo antibacteriana, antifúngica, antiparasitaria, antiinflamatoria, hemostática, antiespasmódica, antioxidante, estrogénica e incluso para el tratamiento contra el cáncer [4]. Esta ha sido descrita como una planta medicinal tradicional con efectos similares a los que se ha mencionado para el β-Cariofileno, este sesquiterpeno posee una amplia variedad de propiedades biológicas tales como antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales, neuroprotectoras, entre otras. Estos artículos, han sido en su mayoría estudios *in vivo* e *in vitro*, además, estudios pre clínicos han indicado que el β-Cariofileno actúa como un modulador del sistema nervioso, con actividad antiinflamatoria, ansiolítica y neuroprotectora contra enfermedades neurodegenerativas [5] mediante una serie de mecanismos propuestos, como la reducción de la expresión de enzimas como ciclooxigenasa-2 (COX-2) y óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), relacionadas con procesos neuroinflamatorios en la producción y estimulación de citoquinas proinflamatorias [6,7]. Si bien se ha descrito el potencial farmacológico del β-Cariofileno, existe poca información acerca de un método de cuantificación de este metabolito por separado y más aún que valide dicho método. Actualmente, en la literatura se describen varios métodos de extracción (Soxhlet e hidrodestilación) y separación de β-Cariofileno (CG y HPLC). Sin embargo, estos artículos se han centrado principalmente en la caracterización de β-Cariofileno, así como otros componentes en aceites esenciales de plantas que se han descrito contienen el sesquiterpeno, además, las validaciones encontradas se encaminan a determinar una mezcla de terpenos diferentes, encontrando pocas enfocadas exclusivamente en el β-Cariofileno mediante CG.

Debido al interés de este metabolito y la falta de información sobre procesos de cuantificación validados, se hace necesaria la validación de un método de cuantificación individual de β-Cariofileno, llevando al planteamiento del proyecto, para el cual se busca determinar la concentración de β-Cariofileno en flores, hojas y tallos del extracto de *Achillea millefolium*, mediante la separación por cromatografía de gases (CG) adaptado al detector FID y la validación del proceso, hallando los parámetros cromatográficos necesarios como linealidad, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación, pues estos parámetros son requeridos para establecer un método de análisis de cuantificación preciso, exacto, reproducible y altamente selectivo, por lo cual, la idoneidad del proyecto se basa en la importancia de la validación en la industria farmacéutica. Pues esta es el establecimiento de la evidencia documentada de que un procedimiento analítico conducirá, con alto grado de seguridad, a la obtención de resultados precisos y exactos, dentro de ciertos atributos de calidad establecidos. Es necesario realizar una validación para demostrar que el método es adecuado para los análisis propuestos en las condiciones descritas, además, es parte integral del desarrollo de un método analítico y porque es necesario trabajar con métodos que ofrezcan confianza y seguridad en los resultados [8].

## 2. Resultados

### *2.1. Condiciones cromatográficas de separación.*

Para la separación y cuantificación del analito, se realizaron distintos ensayos y se evaluaron las condiciones cromatográficas empleadas previamente por Farhadi et al., quienes caracterizaron los componentes de los aceites volátiles de *Achillea millefolium* mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama y espectrometría de masas (CG/MS); el análisis CG-FID se realizó empleando gas helio como vehículo (0,8 ml/min), la temperatura del inyector fue de 300,0 °C y se inyectó 1,000 μL de muestra de aceite en modo Split [9]. Se tuvo en cuenta que las condiciones experimentales del estudio mencionado y las empleadas para este trabajo fueron distintas, por ejemplo, Farhadi et al. emplearon una columna HP-5MS al 5% (30 m × 0,25 mm d.i.; espesor de película de 0,25 μm), y para este trabajo se empleó la columna capilar SH-I-5SIL MS de Shimadzu (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm, composición 5% fenil - 95% dimetilpolisiloxano). Por estas variaciones,

al replicar las condiciones cromatográficas del estudio empleando la matriz como prueba preliminar, se obtuvo un cromatograma deficiente y de baja calidad (Figura 1), pues contiene una línea base inestable, problemas en la resolución y picos asimétricos; además, se evidenció la elución del β-Cariofileno a los 20,6, minutos. Por lo anterior, fue necesario ajustar algunas de las condiciones hasta obtener un pico simétrico y resuelto del analito a los 7,751 minutos (Figura 5), lo que indicó que se hallaron las condiciones adecuadas para su validación, descritas en la Tabla 1.

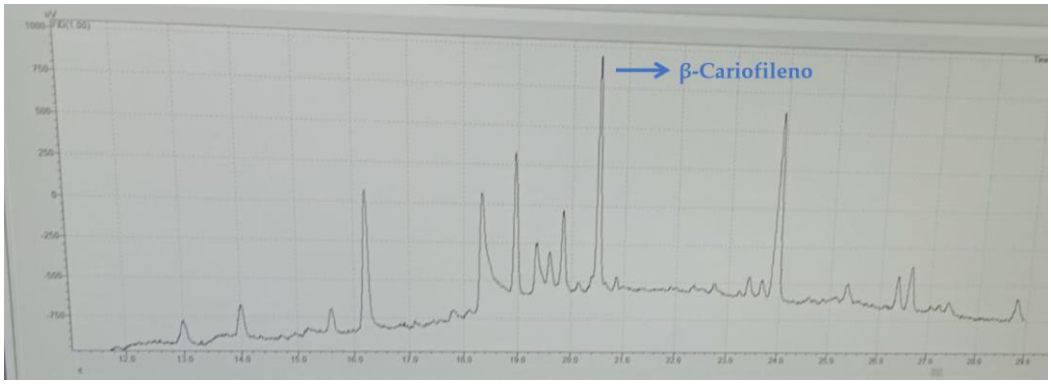



**Figura 1.** Cromatograma de separación de β-Cariofileno en el extracto de las flores de *Achillea millefolium* por CG con condiciones iniciales.

Una vez se definieron las condiciones cromatográficas óptimas reportadas en la Tabla 1, se emplearon para inyectar el patrón de β-Cariofileno (Figura 2) con el fin de establecer su tiempo de retención y así identificar el analito con seguridad al inyectar la matriz de análisis.

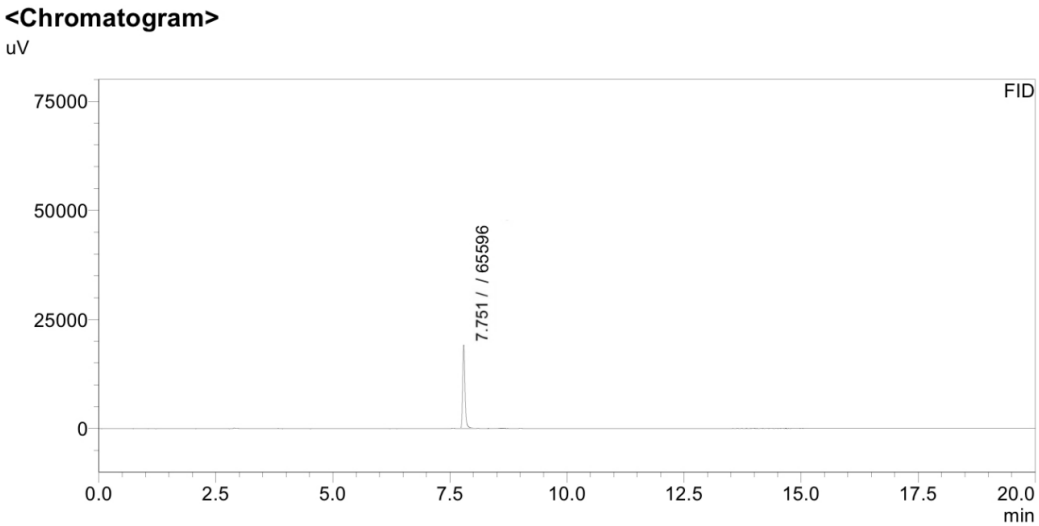



**Figura 2.** Inyección de patrón solo y con las condiciones optimizadas.

**Tabla 1.** Condiciones óptimas para la separación y cuantificación de β-Cariofileno presente en el extracto de flores de milenrama mediante CG-FID.

| Parte del equipo | Item | Valor | Unidades |
|---|---|---|---|
| AOC-20i+s | Temperatura SPL | 260,0 | °C |
| | Presión SPL | 87,90 | kPa |
| | Flujo de la columna | 0,6000 | mL/min |
| | Velocidad lineal | 23,70 | cm/s |
| | Relación de Split | 20,00 | |
| | Flujo total | 15,60 | mL/min |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Flujo de purga | 3,000 | mL/min |
| | Presión primaria | 453,7 | kPa |
| Columna SH-I-5Sil MS | Rango de temperatura | -60,00 a 320,0/350,0 | °C |
| | Longitud | 30,00 | m |
| | Diámetro interno | 0,2500 | mm |
| | Grosor de la película | 0,2500 | µm |
| FID | Temperatura | 260,0 | °C |
| | Flujo $N_2$ | 24,00 | mL/min |
| | Flujo $H_2$ | 40,00 | mL/min |
| | Flujo de aire | 200,0 | mL/min |

Además, Farhadi et al. fijaron la temperatura del horno en 60,00 °C y la programaron para aumentar a 4,000 °C/min hasta 280,0 °C [9]. Teniendo esta rampa de temperatura como base, para la selección del gradiente térmico se realizaron distintos ensayos hasta definir como mejor opción empezar en 150,0 °C durante 3 minutos, seguida de un gradiente de 10,00 °C/min hasta 240,0 °C (Figura 3), pues se evidenció que presentaba mejor resolución y simetría del pico de β-Cariofileno y una línea base estable (Figura 5).

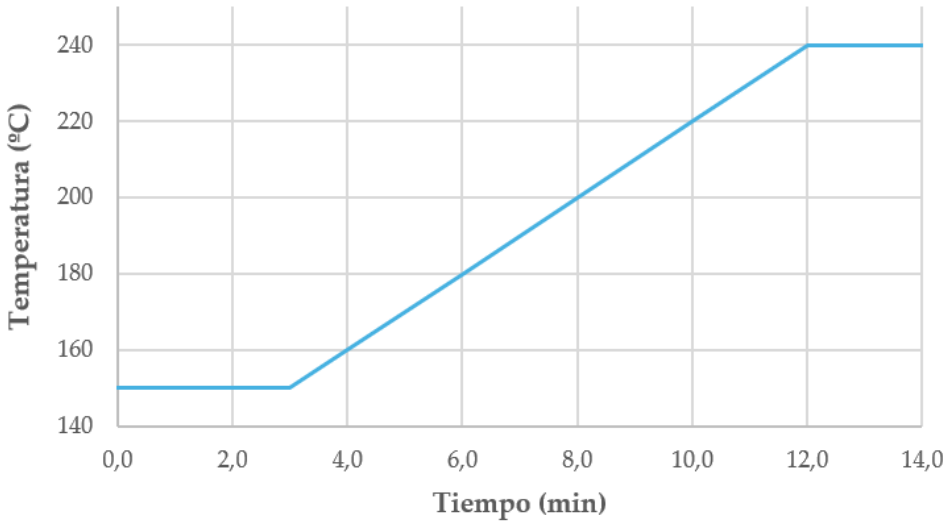



**Figura 3.** Rampa de temperatura empleada para la separación de β-Cariofileno por CG-FID.

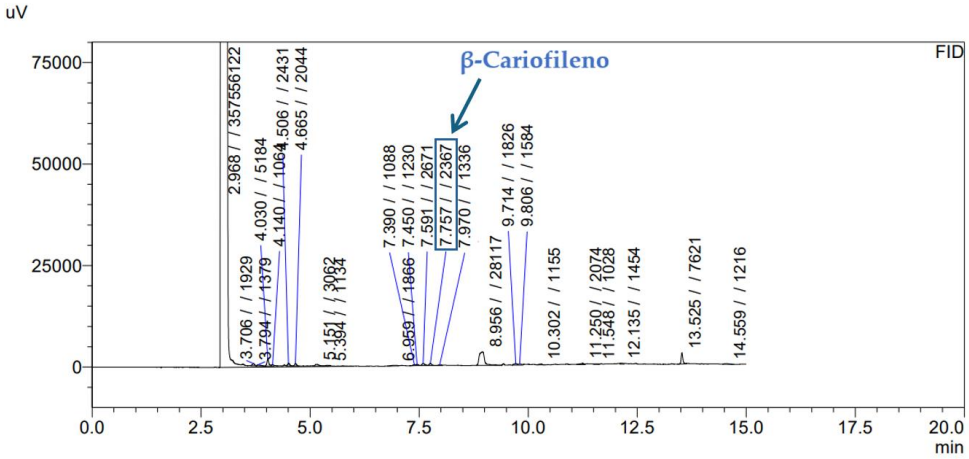
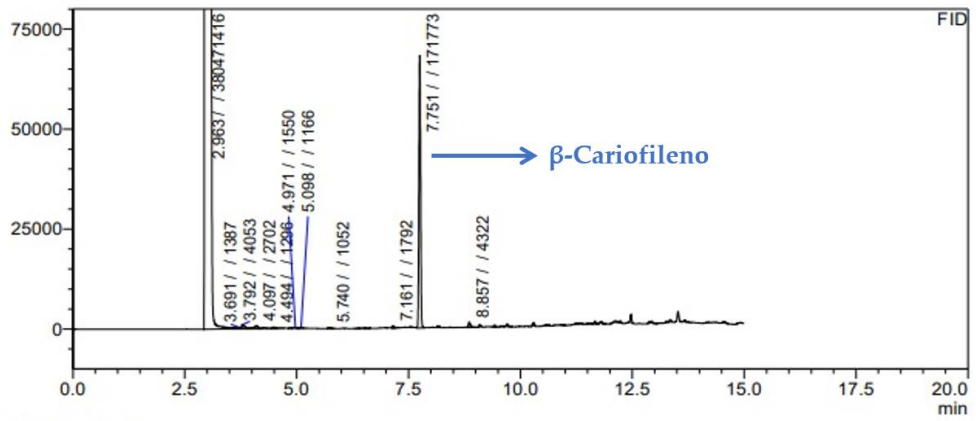



**Figura 4.** Inyección de matriz sin patron y condiciones optimizadas.

Después de optimizar las condiciones cromatográficas para la separación de β-Cariofileno se realizó una inyección de matriz en ausencia de patrón, donde se obtuvo el cromatograma de la Figura 4. Esto con el fin de verificar que el tiempo de retención del patrón (Figura 2) fuera el mismo que el que se encontraría en la matriz (Figura 4).




**CARIOFILENO**

FID

| Peak# | Ret. Time | Area | Height | Unit | HETP(USP) | Width at 50% Height |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2.963 | 380471416 | 90596504 | | 16.392 | 0.070 |
| 2 | 3.691 | 1387 | 260 | | 10.151 | 0.080 |
| 3 | 3.792 | 4053 | 915 | | 7.738 | 0.069 |
| 4 | 4.097 | 2702 | 673 | | 5.163 | 0.067 |
| 5 | 4.494 | 1296 | 308 | | 4.326 | 0.063 |
| 6 | 4.971 | 1550 | 256 | | 7.661 | 0.106 |
| 7 | 5.098 | 1166 | 261 | | 5.160 | 0.069 |
| 8 | 5.740 | 1052 | 301 | | 2.217 | 0.052 |
| 9 | 7.161 | 1792 | 565 | | 1.176 | 0.047 |
| 10 | 7.431 | 1898 | 228 | | 46.247 | -- |
| 11 | 7.544 | 2200 | 327 | | 5.963 | 0.119 |
| 12 | 7.751 | 171773 | 67281 | | 0.699 | 0.040 |

**Figura 5.** Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas para la separación de β-Cariofileno en el extracto de las flores de *Achillea millefolium* por CG-FID.

Una vez se obtuvo el cromatograma de la Figura 5, con el fin de optimizar las condiciones cromatográficas se evaluaron los parámetros cromatográficos expresados en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros cromatográficos.

| Parámetro | Resultado |
|---|---|
| Tiempo de retención (min) | 7,751 |
| Tiempo muerto (min) | 1,894 |
| Tiempo de retención corregido (min) | 5,857 |
| Factor de retención (k) | 3,092 |
| Selectividad ($\alpha$) | 1,112 |
| Resolución ($Rs$) | 6,823 |
| Número de platos teóricos (N) | 128606 |

Inicialmente, se empleó la Ecuación 1 para determinar el tiempo de retención corregido del pico del β-Cariofileno que eluyó a los 7,751 min; el tiempo de retención

corregido es el tiempo en el cual un analito pasa por la columna, y se obtiene con la diferencia entre el tiempo de retención de dicho compuesto y el tiempo muerto, siendo este último el tiempo que tarda una especie no retenida en atravesar la columna. Para la cromatografía de gases, se emplea el metanol debido a que es un compuesto altamente volátil que no tiene mayor interacción con la fase estacionaria, por lo que proporciona una medida del tiempo muerto. En este caso, se realizó la corrida cromatográfica de un vial con metanol, y el tiempo de retención fue de 1,894 min, por lo que se calculó un tiempo de retención corredigo del analito de 5,857 min.

**Ecuación 1:** Tiempo de retención corregido ($t_R'$)

$$t_R' = t_R - t_m \quad (1)$$

Donde $t_R$ es el tiempo de retención

$t_m$ es el tiempo muerto

$$t_R' = 7{,}751 \text{ min} - 1{,}894 \text{ min} = 5{,}857 \text{ min}$$

Contar con el tiempo de retención corregido permitió determinar el factor de retención (k) a partir de la Ecuación 2, obteniendo como resultado 3,092.

**Ecuación 2:** Factor de retención (k)

$$k = (t_R - t_m) / t_m \quad (2)$$

$$k = (7{,}751 \text{ min} - 1{,}894 \text{ min}) / 1{,}894 \text{ min} = 3{,}092$$

Para evaluar la selectividad, que es el tiempo o la distancia entre dos picos, se examinan los picos de los compuestos con tiempos de retención cercanos al analito para evaluar su separación. Se obtiene calculando el cociente entre el factor de retención de la especie más retenida (k2) y la menos retenida (k1). En este caso, el β-Cariofileno es el analito y la especie más retenida, debido a que en la Figura 5 se evidencia que el pico más cercano se sitúa a los 7,161 min, correspondiente a la especie menos retenida. Una vez establecido esto, se calculó el factor de retención para esta especie empleando la Ecuación 2, lo que resultó en un k1 de 3,092. Luego, aplicando la Ecuación 3, se obtuvo una selectividad de 1,112.

**Ecuación 3:** Selectividad ($\alpha$)

$$\alpha = k2 / k1 \quad (3)$$

Donde k2 es el factor de retención de la especie más retenida

k1 es el factor de retención de la especie menos retenida

$$k1 = (7{,}161 \text{ min} - 1{,}894 \text{ min}) / 1{,}894 \text{ min} = 2{,}781$$

$$\alpha = 3{,}092 / 2{,}781 = 1{,}112$$

El número de platos teóricos (N) se calculó a partir de la Ecuación 4 teniendo en cuenta que el ancho de la base a media altura ($W_{0,5}$) del pico correspondiente al β-Cariofileno es de 0,04700 min; obteniendo un N de 128606. A partir de este valor y la Ecuación

5, se calculó la resolución, que es la capacidad de la columna para separar los compuestos de interés. Así, se obtuvo una resolución de 6,823.

**Ecuación 4:** Número de platos teóricos (N)

$$N = 5{,}55 * (t_R / W_{0,5})^2 \quad (4)$$

$$N = 5{,}55 * (7{,}161 \text{ min} / 0{,}04700 \text{ min})^2 = 128606$$

**Ecuación 5:** Resolución (R)

$$Rs = ¼ \sqrt{N} \ (\alpha - 1 / \alpha) \ (k / (k + 1)) \quad (5)$$

$$Rs = ¼ \sqrt{128606} \ (1{,}112 - 1 / 1{,}112) \ (3{,}092 / (3{,}092 + 1)) = 6{,}823$$

*2.2. Cuantificación de β-Cariofileno en flores, hojas y tallos de Achillea millefolium.*

Para la cuantificación de β-Cariofileno en los extractos obtenidos de las flores, hojas y tallos de la milenrama se aplicó el método de adición estándar, por lo que para cada parte de la planta se construyó una curva de calibración de once puntos a partir de soluciones que contienen la misma cantidad de extracto, volúmenes ascendentes de patrón y etanol. En la Tabla 3 se reportan las señales obtenidas al realizar la corrida cromatográfica de las soluciones, útiles para construir las curvas de calibración.

**Tabla 3.** Señales obtenidas para la construcción de las curvas de calibración.

| Vial | Concentración (ppm) | Señal | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Flores | Hojas | Tallos |
| 1 | 0,000 | 1324 | 1187 | 1004 |
| 2 | 7,933 | 6886 | 10138,5 | 6875 |
| 3 | 15,87 | 12624 | 17558 | 12643,5 |
| 4 | 31,73 | 24302 | 33790,5 | 24393 |
| 5 | 63,46 | 48921 | 65822 | 48802 |
| 6 | 95,19 | 70522 | 101700 | 70343 |
| 7 | 126,9 | 93810 | 136607 | 90937 |
| 8 | 158,7 | 113230 | 171762,5 | 116260 |
| 9 | 190,4 | 136164 | 216797 | 136473 |
| 10 | 222,1 | 160419 | 244238,5 | 159355 |
| 11 | 253,8 | 182881 | 292655 | 183590 |

Previo a la construcción de las curvas, se aplicó el test de Dixon (Prueba Q) a las señales máximas y mínimas obtenidas con el fin de identificar valores atípicos. Para cada curva se graficaron las señales de los once puntos (Tabla 3), lo que corresponde a diez grados de libertad; el valor crítico para este tamaño de muestra con un nivel de confianza de 95,00% es 0,3920 [10]. Luego de determinar la Q calculada para los puntos mínimos (Tabla 4) y máximos (Tabla 5) de las curvas de flores, hojas y tallos con base a la Ecuación 6, se evidencia que en todos los casos Q tabulada fue mayor a Q calculada, por lo que ningún valor fue descartado.

**Ecuación 6:** Q calculada

$$Q = |Xa - Xb| / R \quad (6)$$

Donde $|Xa - Xb|$ es la divergencia

Xa es el valor atípico sospechado

Xb es el dato más cercano a Xa

R es el rango del conjunto de datos

**Tabla 4.** Aplicación de el test de Dixon (Prueba Q) para el descarte de datos mínimos para la construcción de las curvas de calibración.

| Item | Resultado | | |
|---|---|---|---|
| | **Curva flores** | **Curva hojas** | **Curva tallos** |
| Dato mínimo | 1324 | 1187 | 1004 |
| Divergencia | 5562 | 8952 | 5871 |
| Recorrido | 181557 | 291468 | 182586 |
| Grados de libertad | 10 | 10 | 10 |
| Q calculada | 0,03064 | 0,03071 | 0,03215 |
| Q tabulada | 0,3920 | 0,3920 | 0,3920 |
| ¿Se descarta? | No | No | No |

**Tabla 5.** Aplicación de el test de Dixon (Prueba Q) para el descarte de datos máximos para la construcción de las curvas de calibración.

| Item | Resultado | | |
|---|---|---|---|
| | **Curva flores** | **Curva hojas** | **Curva tallos** |
| Dato máximo | 182881 | 292655 | 183590 |
| Divergencia | 22462 | 48416,5 | 24235 |
| Recorrido | 181557 | 291468 | 182586 |
| Grados de libertad | 10 | 10 | 10 |
| Q calculada | 0,1237 | 0,1661 | 0,1327 |
| Q tabulada | 0,3920 | 0,3920 | 0,3920 |
| ¿Se descarta? | No | No | No |

Una vez se verificó que ninguna señal obtenida fue sospechosa, se construyeron las curvas de calibración (Figura 6-8) y con base a la Ecuación 7 se determinó la concentración de β-Cariofileno en los extractos de *Achillea millefolium*, obteniendo 6,189 ppm en flores; 4,670 ppm en hojas y 5,452 ppm en tallos.

**Ecuación 7:**

$$[Cm] = (\mathrm{b/m})(\mathrm{Vr/Vo}) \tag{7}$$

Donde $\mathrm{Vr}$ es el volumen total de aforo

$\mathrm{Vo}$ es el volumen de muestra adicionado

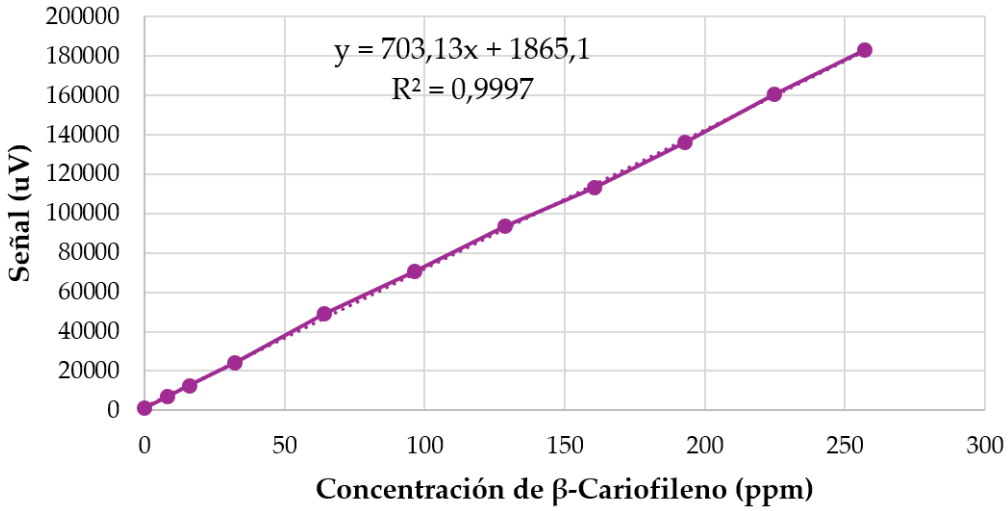



**Figura 6.** Curva de calibración por adición estándar de β-Cariofileno en extracto de flores de *Achillea millefolium*.

$C_{flores}$ = (1865,1 uV / 703,13 (uV/ppm))(1400 µL/600 µL) = 6,189 ppm

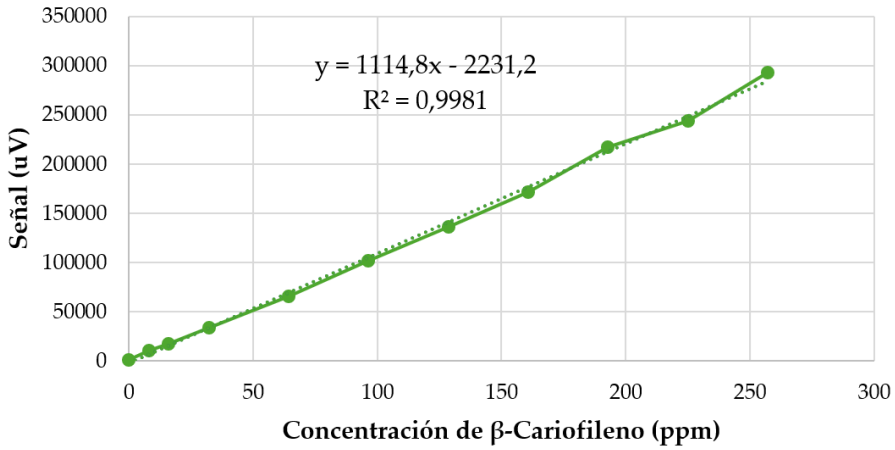



**Figura 7.** Curvas de calibración por adición estándar de β-Cariofileno en extracto hojas de *Achillea millefolium*.

$C_{hojas}$ = (2231,2 uV / 1114,8 (uV /ppm))(1400 µL/600 µL) = 4,670 ppm

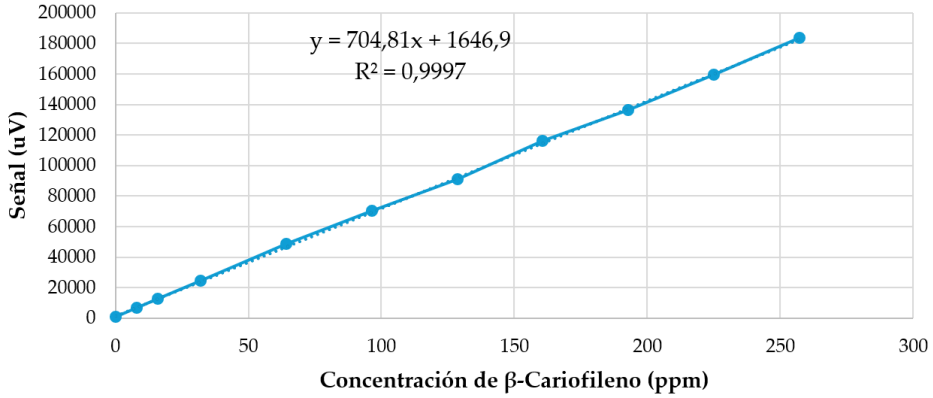



**Figura 8.** Curvas de calibración por adición estándar de β-Cariofileno en extracto de tallos de *Achillea millefolium*.

$C_{tallos}$ = (1646,9 uV / 704,81 (uV /ppm))(1400 µL/600 µL) = 5,452 ppm

A continuación, se calculó la cantidad de β-Cariofileno por gramo de material vegetal pesado, teniendo en cuenta que se pesaron 0,5000 g de cada parte de la milenrama y se disolvieron en 10,00 mL de etanol. Así, se obtuvieron 2,8882 mg β-Cariofileno/g flores, 2,179 mg β-Cariofileno/g hojas, y 2,544 mg β-Cariofileno/g tallos. Se presenta la muestra de este cálculo realizado tomando como ejemplo la cantidad del analito en flores.

**Concentración de β-cariofileno en el extracto** = (6,189 ppm*1400 μL)/60 μL= 144,41 ppm

**mg de β-cariofileno en el extracto** = 0,01 L*144,41 mg/L = 1,4441 mg β-cariofileno

**mg β-cariofileno/g de material vegetal (Flores)** = 1,4441 mg/0,5 g= 2,8882 mg/g

*2.3. Validación del método.*

*2.3.1. Linealidad.*

La linealidad del método se evaluó partiendo de las curvas de calibración de cada parte de la planta por el método de adición estándar (Figura 6-8), en donde se calculó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación para hallar la concentración de cada una de ellas.

Se realizó por duplicado la curva de calibración por adición estándar del extracto de flores de la milenrama (Figura 6 y Figura 9) y un análisis de la varianza ANOVA para determinar si hay diferencias significativas entre las dos curvas. Tras este análisis, no se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 6), lo que sugiere que ambas curvas son válidas y que el método es confiable.

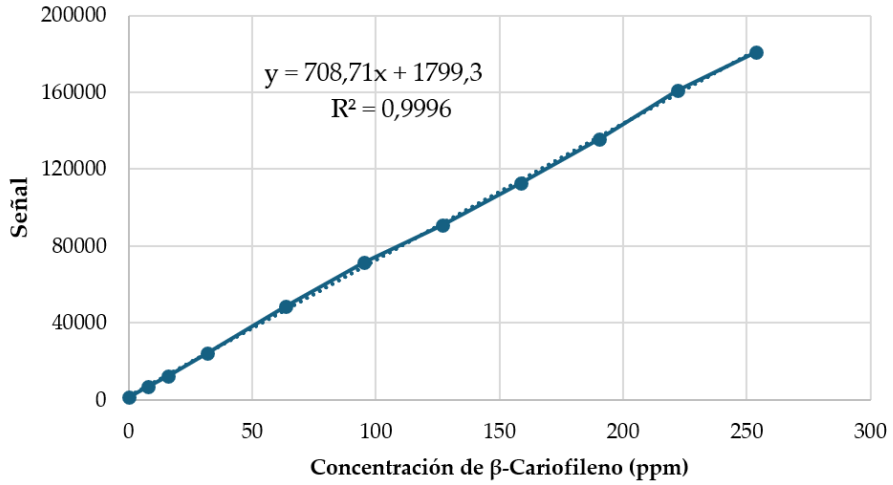



**Figura 9.** Curva de calibración de adición estándar por duplicado de β-Cariofileno en el extracto de flores de *Achillea millefolium*.

**Tabla 6.** Análisis ANOVA para el extracto de flores.

| Origen de las variaciones | Suma de cuadrados | Promedio de Cuadrados | F | Valor crítico para F |
|---|---|---|---|---|
| Entre grupos | 1068763,682 | 1068763,68 | 0,00026 | 4,350 |
| Dentro de los grupos | 82908012718 | 4145400636 | | |

*2.3.2. Precisión.*

La precisión del método se evaluó a través de la repetibilidad y la reproducibilidad utilizando una de las soluciones preparadas para la curva de calibración por adición estándar. El vial usado contenía 600,0 μL del extracto de flores, 300,0 μL de la solución madre y 500,0 μL de etanol. Cuya concentración corresponde a 95,19 ppm. Para determinar la repetibilidad, el mismo analista (A) realizó ocho mediciones el mismo día. En cuanto a la reproducibilidad, se involucró a tres analistas diferentes (A, B y C), asignando a cada uno un día distinto para realizar cinco mediciones. En donde, por separado, cada analista preparó la solución y la inyectó al cromatógrafo de gases. A partir de los resultados, se calculó la media aritmética, la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV) para los tiempos de retención registrados. En la Tabla 7 se reportan los resultados de las mediciones, que fueron analizadas calculando la desviación estándar y el coeficiente de variación. En ambos ensayos se evidencian valores bajos, lo que indica que los datos están uniformemente distribuidos alrededor de la media.

**Tabla 7.** Ensayos de repetibilidad y reproducibilidad para determinar la precisión del método de cuantificación.

| No. de análisis | Tr (min) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Repetibilidad | Reproducibilidad | | |
| | Analista A | Analista A | Analista B | Analista C |
| 1 | 103370 | 103450 | 103451 | 104353 |
| 2 | 103720 | 104236 | 104356 | 104353 |
| 3 | 104130 | 105690 | 104368 | 103864 |
| 4 | 103390 | 103945 | 104465 | 103854 |
| 5 | 103710 | 104685 | 104868 | 104668 |
| 6 | 104120 | | | |
| 7 | 103380 | | | |
| 8 | 103730 | | | |
| Media | 103743,3 | | 104307,1 | |
| s | 325,35 | | 573,5 | |
| CV (%) | 0,31 | | 0,5 | |

*2.3.3. Exactitud.*

La exactitud consistió en la preparación de tres muestras para cada uno de los tres niveles de concentración (80,00%, 100,0% y 120,0%), teniendo en cuenta que la concentración teórica era 137,89 ppm. Cada muestra se midió por triplicado mediante CG-FID, en donde se calculó la concentración real y así hallar el porcentaje de recuperación mediante la Ecuación 8, de la misma manera se realiza el proceso para los viales identificados con 80,00% y el 120,0%. En donde se obtienen los resultados mostrados en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Viales límites preparados para determinar la exactitud del método.

| | Vial 1 | Concentración teórica (ppm) | Concentración real (ppm) | % recuperación | Promedio % recuperación |
|---|---|---|---|---|---|
| 80,00% | 118087 | 110,3 | 107,6 | 97,55 | 98,45 |
| | 120111 | | 109,4 | 99,37 | |
| | 119457 | | 108,8 | 98,64 | |
| | **Vial 2** | **Concentración teórica (ppm)** | **Concentración real (ppm)** | **% recuperación** | **Promedio % recuperación** |
| 100,0% | 154892 | | 140,2 | 101,7 | |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 154632 | 137,9 | 140,0 | 101,5 | 101,6 |
| | 154645 | | 140,0 | 101,5 | |
| | **Vial 3** | **Concentración teórica (ppm)** | **Concentración real (ppm)** | **% recuperación** | **Promedio % recuperación** |
| 120,0% | 190410 | | 171,7 | 103,7 | |
| | 190238 | 165,5 | 171,5 | 103,6 | 103,6 |
| | 189870 | | 171,2 | 103,4 | |

Haciendo uso de la Tabla 8 donde se indica la concentración real y teórica de las soluciones en cada vial, se pudo calcular el porcentaje de recuperación mediante la Ecuación 8, obteniendo para los tres niveles de concentración porcentajes de recuperación de 98,45%, 101,6% y 103,6% respectivamente, alcanzando una recuperación media de 101,2%.

**Ecuación 8:** Porcentaje de recuperación.

$$\%\,Recuperación = \frac{concentración\ real}{concentración\ teórica} \times 100 \tag{8}$$

*2.3.4. Límites de detección y cuantificación (LDD y LDC).*

Para determinar los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) se prepararon 6 viales cuyo contenido de patrón fue de 0 µL, 2,5 µL, 20 µL, 30 µL, 60 µL y 70 µL (Tabla 9). Cada vial se analizó por duplicado, en donde, se construyó una curva de calibración por adición estándar por cada ronda de análisis, luego se promediaron las señales y se obtuvo la ecuación de la recta (Tabla 10 y Figura 10). Esto con el fin de obtener la pendiente (m) y el término independiente (b) para finalmente hacer uso de las Ecuaciones 9-10 obteniendo así los límites de detección y cuantificación.

**Tabla 9.** Preparación de los viales para la construcción de la curva de calibración por el método de adición estándar para la determinación de los límites de detección y cuantificación.

| Vial | Volumen añadido (µL) | | |
|---|---|---|---|
| | **Extracto** | **Patrón** | **Etanol** |
| 1 | 60,00 | 0,000 | 1340 |
| 2 | 60,00 | 2,500 | 1337,5 |
| 3 | 60,00 | 20,00 | 1320 |
| 4 | 60,00 | 30,00 | 1310 |
| 5 | 60,00 | 60,00 | 1280 |
| 6 | 60,00 | 70,00 | 1270 |

**Tabla 10.** Promedio de los ensayos realizados por duplicado para determinar el límite de detección y cuantificación mediante la construcción de la curva de calibración de adición estándar de β-Cariofileno en el extracto de flores de *Achillea millefolium*.

| Concentración (ppm) | Vol. Patrón (µL) | Concentración (ppm) | Señal |
|---|---|---|---|
| | 0,000 | 0 | 105,3 |
| | 2,500 | 0,8036 | 705,5 |
| 450 | 20,00 | 6,429 | 6411 |
| | 30,00 | 9,643 | 9736 |
| | 60,00 | 19,29 | 19504 |
| | 70,00 | 22,50 | 22497,5 |

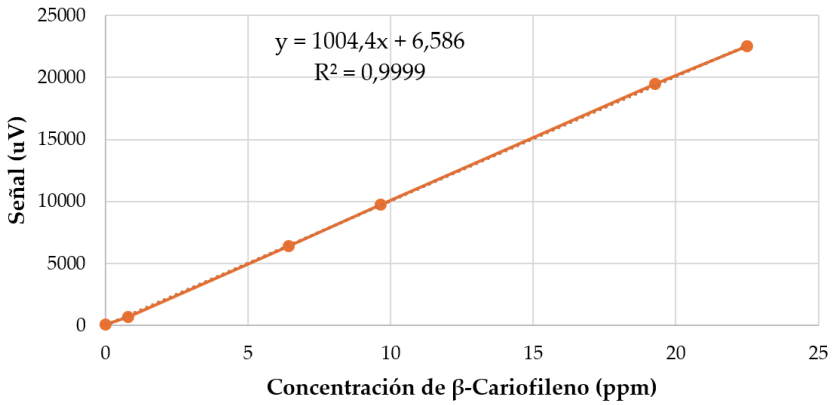



**Figura 10.** Curva de calibración por adición estándar de LDD y LDC.

Se determinaron los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) del método con el fin de conocer la cantidad mínima de analito necesaria para obtener un resultado significativo. En la Tabla 10 se reportan las señales resultantes de las mediciones de cada solución por CG-FID, que permitieron la construcción de la curva de calibración por el método de adición estándar (Figura 10), la obtención de la ecuación de la recta (y = 1004,4x + 6,586) y el cálculo del error típico mediante Excel (116,1). Teniendo en cuenta la pendiente y empleando las Ecuaciones 9-10, se determinó que el LDD es 0,3815 ppm y el LDC es 1,156 ppm.

**Ecuación 9:** Límite de detección.

$$LDD = (3{,}3 * \text{error típico}) / m \tag{9}$$

$$LDD = (3{,}3 * 116{,}1) / (1004{,}4) = 0{,}3815 \text{ ppm}$$

**Ecuación 10:** Límite de cuantificación.

$$LDC = (10 * \text{error típico}) / m \tag{10}$$

$$LDC = (10 * 116{,}1) / (1004{,}4) = 1{,}156 \text{ ppm}$$

## 3. Discusión

Para la extracción del aceite esencial de la milenrama se realizó una revisión bibliográfica acerca de estudios previos en los que se empleó el método de hidrodestilación. Karami et al. secaron, molieron y tamizaron las partes de la planta milenrama para pesar 80 g y mezclarlos con 1600 mL de solución salina (0,7% (p/v)) en un balón aforado, y realizaron la extracción durante 180 minutos a 100 °C, obteniendo rendimientos en un rango de 0,093 p/v a 0,246 p/v [11]. Barghamadi et al. pesaron 70 g de la planta y la sometieron a hidrodestilación durante 4 horas a 35 °C empleando un equipo Clevenger, recogieron el destilado volátil con ayuda de sulfato de sodio anhidro y lo refrigeraron antes del análisis, logrando un rendimiento de 0,21% p/p [12]. Mollasalehi et al. pesaron 50 g de polvo seco de la planta y agregaron 200 mL de agua destilada para dejar en reposo durante una hora, luego realizaron la extracción durante 2,5 horas, se recogió el aceite esencial extraído y se deshidrató con sulfato de sodio anhidro obteniendo un rendimiento del 0,25%; además, en este estudio compararon la extracción por hidrodestilación con la extracción asistida por microondas. Para este último método se pesaron 50 g de la planta y lo sumergieron en 300 mL de agua destilada a temperatura ambiente durante 1 hora, luego el material vegetal húmedo se transfirió a un balón aforado del sistema Clevenger a 300 W durante

15 minutos, el aceite esencial se recogió y deshidrató con sulfato de sodio anhidro, y se logró el rendimiento más alto de 0,53% [13].

En este trabajo, inicialmente se realizó una extracción por hidrodestilación atendiendo a las condiciones experimentales determinadas por Sierra y Zamora, quienes realizaron una aproximación a la cuantificación de β-Cariofileno por CG-FID mediante la técnica de HeadSpace [14], sin embargo, fue necesario ampliar la búsqueda bibliográfica acerca de la naturaleza y estructura química del β-Cariofileno ya que los resultados obtenidos en la cuantificación extrayendo con agua e inyectado por la técnica de HeadSpace no eran repetibles ni reproducibles. En donde se encontró que el β-Cariofileno es un compuesto orgánico que pertenece a la clase de los sesquiterpenos, es decir, son compuestos que están conformados por tres unidades de isopreno, lo que significa que tienen 15 átomos de carbono en su estructura. Ya que su estructura se conforma principalmente de carbono e hidrógeno, presenta pocas o ninguna región polar en su estructura, lo que deriva en una baja afinidad hacia compuestos de naturaleza polar como el agua, por lo que este compuesto se clasifica como molécula hidrofóbica y, en consecuencia, muy soluble en disolventes orgánicos poco polares [9]. Debido a la baja solubilidad de este metabolito en agua, muy poca cantidad del mismo se disolvió y se evidenciaron dos fases en el vial y esto imposibilitaba una correcta cuantificación. Por esta razón, se realizó una prueba de solubilidad (Anexo 1) donde se prepararon 3 viales con diferentes proporciones de solución stock de β-Cariofileno y se modificaron las proporciones de agua y etanol donde se observa como el vial que contiene mayor proporción de agua presenta turbidez con una coloración blanca, lo que permite evidenciar que la solución no se está disolviendo por completo. Por otro lado, el vial que contiene las mismas proporciones de agua y etanol no presenta la coloración blanca, sin embargo, sigue presentando cierta turbidez mientras que el vial con mayor proporción de etanol es completamente translucida y no se observa ningún tipo de partícula sin solubilizar.

Teniendo en cuenta los resultados de Mollasalehi et al., y que el analito es un compuesto de naturaleza hidrofóbica, se evaluó una alternativa que consistió en una extracción en etanol asistida con sonda ultrasónica. Este método resultó favorable gracias a que el β-Cariofileno es soluble en aceites, éteres y etanol [15] y la sonda ultrasónica logra intensificar la penetración del disolvente en el interior celular y mejora la transferencia de masa entre el material vegetal y el disolvente, de modo que los materiales intercelulares se transfieren al disolvente gracias a las ondas de choque, las fuerzas de cizallamiento, la microcorriente y los diferenciales de calor y presión [16], generando así una mayor extracción del aceite esencial. Para obtener el intervalo de extracción adecuado fue necesario realizar una búsqueda bibliográfica y hacer múltiples ensayos para determinar la cantidad y duración de los ciclos más adecuados para lograr una extracción óptima, en donde se estableció que los mejores resultados se obtenían cuando se hacía una extracción durante 12 ciclos de 10 segundos cada uno, pues al realizar las corridas cromatográficas del extracto obtenido bajo estas condiciones, se obtuvo un pico con mayor intensidad, lo que representa mayor concentración. Este tiempo fue óptimo debido a que se evidenció que en periodos más prolongados el etanol se evaporaba, resultando así en una matriz más concentrada ya que se perdería parte del volumen previamente definido. Esta alternativa propuesta logró ser beneficiosa para la extracción ya que se redujo el tiempo, temperatura y cantidad de solvente requerida, además, se precisó de menos materiales y equipos de laboratorio. De hecho, a nivel industrial, mientras que la hidrodestilación es un método tradicional para la extracción de aceites esenciales en grandes volúmenes, la extracción por sonda ultrasónica, pese a que puede requerir una inversión inicial mayor en equipos, ofrece tiempos de extracción más cortos, mayor selectividad y la posibilidad de trabajar con solventes más ecológicos.

Junto a este cambio también fue necesario modificar el tipo de inyección, pasando de HeadSpace a inyección automática con Split, esto debido principalmente a que el proceso de preparación de la muestra por HeadSpace involucra un consumo elevado de insumos puesto que las septas y viales utilizados en este tipo de inyección solo permiten realizar una inyección por vial. Esto se debe a que una vez se realiza la primera inyección en el vial, la septa queda perforada y por la ley de difusión y efusión (ley de Graham), se escapaba el excedente de la fase gaseosa generando perdida de la muestra y modificando la concentración del vial [17-19].

En cuanto a la selección de las condiciones cromatográficas se estableció una temperatura de inyección de 260 °C, esto debido a que el β-Cariofileno posee un punto de ebullición cercano a los 250 °C por lo que se tomó un valor de 10 °C por encima del punto de ebullición para garantizar la completa vaporización de la muestra. Adicionalmente, se observó en múltiples ocasiones como los resultados obtenidos a esta temperatura eran consistentes, razón por la cual se decidió mantener esta temperatura de inyección. El tipo de inyección se seleccionó teniendo en cuenta la literatura donde se establece que cuando se trabaja con muestras desconocidas y complejas es recomendable operar con inyección de tipo Split en una relación de 1:20 con el fin de evitar una sobresaturación de la columna con los diversos compuestos presentes en la matriz [17]. Por otro lado, el flujo se determinó mediante el análisis de diversos ensayos donde se observó como las señales de los múltiples compuestos presentes en la matriz experimentaban tiempo de elución muy similares al del analito, lo que ocasionaba una mala resolución en las señales e incluso se lograba evidenciar solapamiento de las mismas señales. Por lo anterior, se modificó y se analizó numerosas veces el flujo del sistema, en donde se pudo concluir que el que presentaba mejor tiempo de elución y separación de las señales fue de 0,6 mL/min.

Con relación a las condiciones de corrida (temperatura del horno) se utilizó una columna C-18 de (SH-5Sil MS) de 30m de longitud. Esta columna fue seleccionada debido a su baja polaridad, lo que facilita que tanto el β-Cariofileno como los demás compuestos apolares presentes en la matriz, interactúen con la fase estacionaria. Esto permite una separación más efectiva de los compuestos dentro de la columna, aprovechando las diferencias de polaridad entre ellos. La columna también presenta una gran longitud que favorece el número de interacciones entre los diferentes compuestos, y esto contribuye aún más su proceso de separación a lo largo del sistema cromatográfico, mejorando así la resolución de las señales [19]. Adicionalmente, el gas de arrastre utilizado como fase móvil fue Nitrógeno ($N_2$) debido a que en la cromatografía de gases es fundamental que la fase móvil no interactúe con la muestra ni con la fase estacionaria, sin contar que este gas no es solo de fácil acceso, sino que por su costo y seguridad lo hace una fase móvil óptima para este análisis [18,19].

Para determinar los parámetros se realizaron múltiples pruebas donde se observó que la temperatura de corrida más adecuada en este método es al utilizar un gradiente de temperatura iniciando desde 150 °C durante 3 minutos y luego aumentar la temperatura en 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura de 240 °C y mantenerla durante 3 minutos como se observa en la Figura 3; lo que se buscó con este gradiente de temperatura es que durante los primeros 3 minutos eluyeran los compuestos con menor afinidad por la fase móvil y la rampa de temperatura se utilizó con el fin de separar el β-Cariofileno de los demás compuestos que presentaban tiempo de retención muy cercanos, específicamente los que afectaban la resolución de este. Finalmente, se estableció 240 °C al final de cada corrida por 3 minutos con el objetivo de asegurar que los compuestos más afines a la fase estacionaria eluyeran completamente del sistema cromatográfico. Esto se debe a que, al recibir mayor energía en forma de calor, las moléculas tienden a moverse más rápidamente a lo largo de la columna, reduciendo las interacciones con la fase estacionaria y facilitando la elución de los compuestos con mayores tiempos de retención [18].

Este gradiente de temperatura junto con las condiciones de inyección previamente establecidas logró permitir la obtención de resultados reproducibles y precisos, esto debido a que el β-Cariofileno presentó el mismo tiempo de retención en cada corrida después de encontrar estas condiciones. Adicionalmente, se evidenció cómo los resultados fueron más consistentes, pues se demostró que las variaciones en la concentración, inicialmente observadas al inyectar varias veces el mismo vial mediante HeadSpace, desaparecieron. Esto confirmó que dichas variaciones se debían a pérdidas de la fase gaseosa a través de las perforaciones de la septa del vial.

Para la elección del detector, se consideraron las dos opciones disponibles en el equipo utilizado, las cuales fueron el detector de ionización de llama (FID) y el detector de conductividad térmica (TCD). Se llevó a cabo una investigación rigurosa donde se encontró más información sobre estudios de β-Cariofileno con detectores FID, razón por la cual se decidió utilizar este último, ya que se contaba con más información de apoyo en cuanto a las posibles temperaturas a utilizar tanto en el estudio del analito de interés como en la información general del detector. Una vez definido el detector a utilizar, se realizó una segunda revisión de los artículos donde se estudiaba el β-Cariofileno con este detector en otras plantas y se encontró un estudio donde se utiliza un detector FID a una temperatura de 250 °C [18,19]. Esta temperatura fue el punto de partida con el cual se comenzó a utilizar el detector para el presente estudio y después de múltiples ensayos, se decidió modificar la temperatura del FID, así como en la inyección, a 260 °C con el fin de garantizar que cualquier compuesto proveniente del sistema cromatográfico se mantuviera en estado gaseoso.

Una vez definidas, con el objetivo de optimizar las condiciones del análisis y obtener resultados precisos y reproducibles, teniendo en cuenta el cromatograma de la Figura 5 se evaluaron los parámetros cromatográficos, que son medidas que proporcionan información importante sobre la eficacia de una separación cromatográfica. En un cromatograma es esencial obtener una buena resolución (Rs) en el menor de tiempo posible, la resolución indica la capacidad de la columna para separar los picos de interés; depende del factor de retención (k), de la selectividad ($\alpha$) y del número de platos teóricos (N). Cuanto mayor sean los valores de resolución y selectividad, mejor será la capacidad del método para separar los compuestos [20]. Por un lado, el factor de retención mide el tiempo transcurrido en la fase móvil en relación con el tiempo transcurrido en la fase estacionaria, por lo que un factor de retención mayor a 10 significaría un exceso de tiempo en el análisis, mientras que los valores menores a 1,0 indicarían una resolución inadecuada ya que el tiempo de análisis sería extremadamente corto, de esta manera lo ideal es obtener un factor de retención dentro de este rango; en la Tabla 2 se evidencia que el factor de retención es de 3,092 y se encuentra entre los límites aceptados [21]. Por otra parte, la selectividad se refiere a la capacidad del sistema cromatográfico para distinguir químicamente los componentes de la muestra, cuando la selectividad ($\alpha$) es mayor a 1,0 los compuestos se consideran bien separados como en el caso de este trabajo, en el que la selectividad fue de 1,112. Por último, el número de platos teóricos es el espacio físico donde el analito alcanza el equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. Es una medida de la eficiencia de la columna, cuanto mayor sea el número de platos teóricos en una columna, más eficiente será; en este caso, $N$ es igual a 128606, por lo que es posible decir que la columna es eficiente y esto podría deberse a su longitud de 30 metros, pues a mayor longitud, mayor eficiencia [22]. Una vez calculados todos los parámetros de los que depende la resolución, se obtuvo un valor de 6,823, lo que indica que la columna separó adecuadamente los picos, pues la resolución debe temer como mínimo un valor de 1,0 para lograr una separación medible y una cuantificación suficiente [23].

Posterior a la separación y cuantificación del analito fue posible determinar la concentración de este en las partes de interés de la milenrama por el método de adición

estándar el cual consiste en utilizar un estándar puro del analito de interés para enriquecer los viales y así permitir no solo la cuantificación del mismo sino también confirmar la presencia del mismo en la matriz analizada. En las Figuras 6-8 se evidencian las curvas de calibración obtenidas a partir del extracto de flores, hojas y tallos. El coeficiente de variación indica qué tan cercanos son los datos a la línea de regresión ajustada; en este caso, los coeficientes de determinación fueron de 0,9989; 0,9981 y 0,9997, respectivamente, y al ser valores cercanos a 1, los modelos obtenidos pueden considerarse fiables para próximas determinaciones, obteniendo resultados lineales entre las señales y la concentración del analito. La Ecuación 6 permitió calcular la concentración de β-Cariofileno presente en los extractos, obteniendo 6,110 ppm en flores; 4,610 ppm en hojas y 3,820 ppm en tallos, por lo que se puede afirmar que las flores de la milenrama son las que tienen una mayor concentración del analito. Por lo anterior, se conoce que la periferia de las plantas, especialmente las flores suelen tener mayor proporción de metabolitos secundarios como el β-Cariofileno, pues debido a los efectos biológicos que presenta como antibiótico, antifúngico, antiviral, entre otros, son capaces de proteger a las plantas de los patógenos [24]. Por esta razón, se esperaría que la flor de la planta tenga la mayor cantidad de metabolitos secundarios pues se trataría de un medio de defensa para evitar que diferentes amenazas alcancen las partes críticas y vitales de la planta. Además, se puede asociar a que generalmente las infusiones que se realizan para tratar diferentes patologías se hacen con la flor de la planta debido a que popularmente se cree que la flor contiene más compuestos con actividad biológica [25].

Para validar el método de cuantificación del analito previamente descrito, se empleó la curva de calibración por adición estándar obtenida del extracto de flores (Figura 6) como referencia. Para verificar la linealidad del método se determinó la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación ($R^2$) de la curva de calibración del extracto de flores, ajustada mediante el método de los mínimos cuadrados (Figura 6). Al evaluar la linealidad, el objetivo es demostrar que el modelo de regresión lineal se ajustó adecuadamente a los datos obtenidos del ensayo, lo que permite predecir el comportamiento de los resultados experimentales con fiabilidad. La ecuación de la recta obtenida fue $y = 1129{,}2x - 2232{,}3$; la pendiente (m) se relaciona de forma directamente proporcional con la sensibilidad del método. En este caso, la pendiente de 1192,2 ppm indica que el método tiene una alta sensibilidad [26]. Por otro lado, el coeficiente de determinación lineal obtenido es de 0,9981, lo que indica precisión del modelo y el buen ajuste de los datos experimentales [27], de tal manera que este resultado satisface el parámetro de linealidad del método analítico al cumplir con el requerimiento de aceptación que se encuentra en la guía ICH Q2, pues este establece que dicho coeficiente de determinación lineal deber ser mayor a 0,995 [28].

Además, se realizó un análisis de varianza también conocido como análisis ANOVA para las curvas de calibración obtenidas con los extractos de las flores con el fin de comprobar si existe o no una diferencia significativa entre los resultados, lo que permite establecer que la hipótesis nula corresponde a que las dos curvas de flores son muy similares y la hipótesis alternativa por el contrario se consideraría como que estas curvas son diferentes. Con esto claro se realizó el análisis de varianza cuyo resultado se evidencia en la Tabla 4 donde se puede observar como el valor crítico para F corresponde a un valor de 4,35 y el valor de F a 0,00025 resultando así que no existe diferencias significativas entre los datos obtenidos entre la primera y segunda curva, resultando en una aceptación de la hipótesis nula, es decir, las curvas de flores son estadísticamente muy similares y no poseen diferencias importantes entre ellas.

En cuanto a la precisión del método fue necesario evaluar la repetibilidad y reproducibilidad, en donde se calculó la media aritmética, la desviación estándar y el coeficiente de variación para los tiempos de retención registrados (Tabla 5), de lo anterior se obtuvo

una desviación estándar de 0,002 y un coeficiente de varianza de 0,2925% lo que significa que los datos no difieren en gran medida entre ellos, esto será relevante puesto que según la guía de validación de métodos cromatográficos de la FDA, un método se considera preciso cuando el coeficiente de varianza es menor que 1 concluyendo así que el método es preciso.

Para evaluar la exactitud del método se usó como límite inferior el 80% del valor real y como límite superior el 120% del valor real como se encuentra en la Tabla 6. Obteniendo así valores muy buenos pues las concentraciones reales se acercan mucho a las concentraciones teóricas en cada uno de los casos, asimismo se obtuvo porcentajes de recuperación igualmente muy buenos y aceptables. Esto debido a que según la guía ICH Q2 refiere el rango de aceptación del porcentaje de recuperación del 98% al 102%, en donde la recuperación media obtenida es de 101,2%, lo que indica que el método propuesto muestra la exactitud para ser considerado aceptable para la cuantificación de β-Cariofileno en la milenrama.

Después de realizar las curvas de calibración correspondientes a la primera y segunda ronda de análisis para hallar los límites de detección y cuantificación se obtuvo la curva de calibración por adición estándar (Figura 10) en donde se obtuvo como ecuación ($y = 1017{,}5x + 6{,}586$) y como $R^2 = 0{,}9999$. Con estos datos se calculó el LDD = 0,3815 ppm y el LDC = 1,156 ppm; lo que indica que la cantidad mínima que puede detectar el método es de 0, 3815 ppm y lo mínimo que puede cuantificar es 1, 156 ppm, estos resultados son óptimos pues las concentraciones que se encontraron en la *Achillea millefolium* de β-Cariofileno se encuentran por encima de estos límites, y dichos límites son muy bajos logrando detectar y cuantificar una cantidad muy pequeña de analito.

## 4. Materiales y Métodos

### *4.1. Equipos y material de laboratorio.*

Para la obtención de los extractos se hizo uso de una balanza analítica OHAUS, sonda ultrasónica Branson UltrasonicsTM CPX-952-538R y centrífuga AFI Sirena Refrigerada. Para la separación del β-Cariofileno se empleó el cromatógrafo de gases NEXIS GC-2030 de SHIMADZU acoplado a los módulos autoinyector/automuestreador AOC-20i+s, y al detector de ionización de llama (FID) para su cuantificación. Para estos procedimientos se emplearon vasos de precipitado de 20,00 mL, un balón aforado de 10,00 mL, vidrio de reloj, tubos Falcon, viales de 2,000 mL para inyección automática con Split y micropipetas de 5-10 μL, 10-100 μL y 100-1000 μL.

### *4.2. Reactivo y estándares de referencia.*

Como patrón de β-Cariofileno, se adquirió (-)*trans*-Caryophyllene - ≥ 98,00% en Sigma-Aldrich Inc. Cuyo certificado de análisis proporcionado por el proveedor contiene información relevante para este estudio, y se encuentra sintetizada en la Tabla 11. Además, se empleó etanol y metanol grado HPLC suministrado por la universidad.

**Tabla 11.** Propiedades físicas y químicas relevantes del patrón (-)*trans*-Caryophyllene - ≥ 98,0%

| Propiedad | Descripción |
|---|---|
| Estado físico | Líquido, claro |
| Punto de fusión | < 25,00ºC |
| Intervalo de ebullición | 262,0 – 264,0ºC |
| Solubilidad en agua | 0,08800 g/L a 20,00ºC |
| Densidad | 0,901 g/cm$^3$ a 25ºC |

*4.3. Recolección de flores, hojas y tallos de Achillea millefolium.*

Las flores, hojas y tallos de milenrama (*Achillea millefolium*) fueron adquiridas en Belmira, Antioquia-Colombia (Coordenadas 6°36'18''N 75°39'57''O), y fueron separadas manualmente, se sometieron a liofilización con el fin de eliminar la mayor cantidad de agua y conservar el mayor tiempo posible el material vegetal.

*4.4. Obtención de extractos de Achillea millefolium.*

El proceso de extracción inició con la reducción del tamaño de partícula de cada parte de la planta por separado haciendo uso de un triturador de alimentos. Luego se tomó un vaso de precipitado, en donde se pesaron 0,5000 g de material vegetal triturado y se añadieron 10,00 mL de etanol grado HPLC. Posteriormente, se realizó la extracción empleando una sonda ultrasónica a una amplitud del 50,00% durante 12 ciclos de 10,00 segundos cada uno. Finalmente, se transfirió a un tubo Falcon en donde se centrifugó a 3000 rpm durante 3,000 minutos para posteriormente ser filtrado haciendo uso de un filtro UNIFLO PTFE de 0,2000 μm para eliminar los residuos sólidos.

*4.6. Preparación de solución patrón.*

Se preparó una solución madre de 450,0ppm en un balón aforado de 10,00 mL añadiendo 5,000 μL de β-Cariofileno y etanol hasta completar aforo; esta solución se empleó para definir unas condiciones cromatográficas que permitieran separar y cuantificar el analito con precisión y exactitud.

*4.7. Cuantificación de β-Cariofileno por el método de adición estándar.*

Para este análisis se empleó el método de adición estándar, lo que implicó la construcción de una curva de calibración específica para cada parte de la planta con el fin de determinar la concentración del analito en las mismas. Para la construcción de cada curva se empleó el extracto correspondiente, la solución madre previamente preparada y once viales de 2,000 mL. En cada uno se agregaron 600,0 μL de extracto; luego a diez viales se le adicionaron, por separado 25,00 μL, 50,00 μL, 100,0 μL, 200,0 μL, 300,0 μL, 400,0 μL, 500,0 μL, 600,0 μL, 700,0 μL y 800,0 μL de la solución madre, para finalmente adicionar etanol hasta completar un volumen de 1400 μL (Tabla 12). Cada vial se llevó a baño ultrasónico para eliminar cualquier presencia de gas y finalizar inyectándolo para obtener las señales de las soluciones y así construir las curvas de calibración por el método de adición estándar (Figura 6-8).

**Tabla 12.** Preparación de los viales para la construcción de las curvas de calibración.

| Vial | Volumen añadido (μL) | | |
|---|---|---|---|
| | **Extracto** | **Solución madre** | **Etanol** |
| 1 | 600,0 | 0,000 | 800,0 |
| 2 | 600,0 | 25,00 | 775,0 |
| 3 | 600,0 | 50,00 | 750,0 |
| 4 | 600,0 | 100,0 | 700,0 |
| 5 | 600,0 | 200,0 | 600,0 |
| 6 | 600,0 | 300,0 | 500,0 |
| 7 | 600,0 | 400,0 | 400,0 |
| 8 | 600,0 | 500,0 | 300,0 |
| 9 | 600,0 | 600,0 | 200,0 |
| 10 | 600,0 | 700,0 | 100,0 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 11 | 600,0 | 800,0 | 0,000 |

## 5. Conclusiones

Tras el desarrollo de este trabajo de investigación, se logró optimizar el método de extracción del aceite esencial de la *Achillea millefolium*, ya que se resolvió el problema relacionado con solubilidad mediante la alternativa asistida por ultrasonido y con etanol como disolvente; además, se validó el método de cuantificación del β-Cariofileno siguiendo los lineamientos propuestos por los estándares de referencia (ICH y USP) presente en la *Achillea Millefolium* (milenrama) haciendo uso de cromatografía de gases adaptado a un detector FID.

Se logró optimizar el método de extracción del aceite esencial de la *Achillea millefolium* con resultados consistentes y reproducibles, solucionando el problema de solubilidad al utilizar etanol grado HPLC y una sonda de ultrasonido con una amplitud del 50% durante 12 ciclos de 10 segundos cada uno a 3000 rpm por 3 minutos.

Se desarrollo un método de separación y cuantificación para el β-Cariofileno en una matriz compleja obtenido a partir de la planta *Achillea millefolium* mediante CG-FID bajo las siguientes condiciones: columna SH-I-5Sil MS, temperatura del inyector a 260,0 °C, Split de 20, nitrógeno como gas de arrastre, flujo de 15,60 mL/min, y una rampa de temperatura que inicia en 150,0 °C durante 3 minutos seguida de un gradiente de 10,00 °C/min hasta 240,0 °C. Estas condiciones permitieron obtener señales para el analito con una buena resolución (>1).

Se determinó que el método cumple con lo estipulado en la ICH Q2 y la USP en cuanto a los parámetros de validación, tras presentarse una buena linealidad de acuerdo al coeficiente de determinación de 0,9981; se evidenció exactitud con un porcentaje de recuperación del 99,41%, además de precisión a través de la reproducibilidad y repetibilidad por la baja dispersión de los resultados. Adicionalmente, se determinó para el método un límite de detección de 0,3770 ppm y un límite de cuantificación de 1,141 ppm.

Según los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, el β-Cariofileno se encuentra presente en las flores, hojas y tallos de *Achillea millefolium* en una concentración de 6,110 ppm; 4,610 ppm y 3,820 ppm respectivamente, lo que permite confirmar que, al realizar una infusión con cualquiera de estas partes de la planta, está presente este metabolito; sin embargo, se recomienda emplear las flores debido a que de allí se obtiene la mayor concentración. De esta manera, se realizó un aporte a próximas investigaciones con respecto al potencial farmacológico del β-Cariofileno teniendo en cuenta sus múltiples actividades biológicas.

**Agradecimientos:** Queremos expresar nuestro profundo agradecimiento a todas las personas que hicieron posible la culminación de este trabajo de grado:

En primer lugar, a nuestro tutor y director de trabajo de grado, Emerson Eliecer León Ávila, gracias por su sabiduría, experiencia y apoyo constante. Su guía y dirección fueron fundamentales para el éxito de este trabajo. Cada sugerencia y recomendación contribuyó enormemente al desarrollo del proyecto.

A nuestras familias, quienes han sido nuestro pilar durante este trayecto formativo, les agradecemos su inquebrantable apoyo, sus consejos y sus valores que han sido fundamentales en nuestro camino hacia el éxito.

Asimismo, agradecemos a los docentes Mónica del Pilar Muñoz Cárdenas y Luis Mauricio Sosa Venegas por su exigencia y rigor durante la evaluación de este trabajo. Su compromiso con la excelencia nos motivó a esforzarnos aún más para alcanzar nuestros objetivos académicos.

Nuestro reconocimiento también se extiende a la Universidad El Bosque por proporcionarnos los recursos y herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto. Agradecemos a los docentes que compartieron sus conocimientos y experiencias, contribuyendo significativamente a nuestra formación como químicos farmacéuticos.

**Conflictos de Intereses:** Los autores declaran que no tienen ningún conflicto de intereses en relación con este artículo.

**Anexo 1.** Prueba de solubilidad.

M = Solución stock

E = Etanol

## Referencias


1. Bahareh, F.F.; Golnaz, B.; Hasti, K. Achillea millefolium: Mechanism of action, pharmacokinetic, clinical drug-drug interactions and tolerability. *Heliyon* **2023**, Volumen 9, Issue 12.
2. Jean, M.B. Yarrow (Achillea millefolium): Flower, Leaf. In *Medicinal Herbs in Primary Care*; Jean, M.B.; pp. 663-667.
3. Ha-Yeon, L.; Min-Jung, K. Thermal decomposition and oxidation of β-caryophyllene in black pepper during subcritical water extraction. *Food Sci Biotechnol.* **2021**, Volumen 30, pp. 1527-1533.
4. Applequist, W. L.; Daniel E. M. Yarrow (Achillea Millefolium L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research. *Economic Botany* **2011**, *Volumen 65*, pp. 209–225.
5. Francomano, F.; Caruso, A.; Barbarossa, A.; Fazio, A.; La Torre, C.; Ceramella, J.; Mallamaci, R.; Saturnino, C.; Iacopetta, D.; Sinicropi, M.S. β-Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. *Appl. Sci.* **2019**, 9, 5420.
6. Yawei, H.; Ziling, Z.; Baojie, W.; Shougang, G. Trans-caryophyllene inhibits amyloid β (Aβ) oligomer-induced neuroinflammation in BV-2 microglial cells. *International Immunopharmacology* **2017**, Volumen 51, pp. 91-98.
7. Shreesh, O.; Hayate, J.; Sheikh, A.; Emdadul, H. β-Caryophyllene, a phytocannabinoid attenuates oxidative stress, neuroinflammation, glial activation, and salvages dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson disease. *Molecular and cellular biochemistry* **2016**, *Volumen 418*, pp. 59-70.
8. Gonzalez, C. M. Aplicación del cálculo de incertidumbre combinada a la validación de una metodología analítica por HPLC, en un product que contiene citalopram bromhidrato. Tesis de pregrado. Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile, 2006.
9. Farhadi, N.; Babaei, K.; Farsaraei, S.; Moghaddam, M.; Pirbalouti, A.G. Changes in essential oil compositions, total phenol, flavonoids and antioxidant capacity of Achillea millefolium at different growth stages. *Industrial Crops and Products* **2020,** *Volumen 152.*
10. Verma, S.P.; Quiroz, A. Critical values for six Dixon tests for outliers in normal samples up to sizes 100, and applications in science and engineering. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* **2006,** *Volumen 23.*
11. Karami, P.; Zandi, M.; Ganjloo, A. Evaluation of key parameters during ohmic-assisted hydro-distillation of essential oil from aerial part of yarrow (Achillea millefolium L.). *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* **2022**, *Volumen 31*.
12. Barghamadi, A.; Mehrdad, F.; Sefidkon, Y.; Khajeh, M. Comparison of the Volatiles of Achillea millefolium L. Obtained by Supercritical Carbon Dioxide Extraction and Hydrodistillation Methods. *Journal of Essential Oil Research* **2009**, *Volumen 21.*

13. Mollasalehi, S.; Kashefi, B.; Hashemi-moghaddam, H. Comparison of Microwave-Assisted and Hydrodistillation Methods for Extraction of Essential Oil from Achillea millefolium. *Journal of Chemical Health Risks* **2013**.
14. Sierra, M.P.; Zamora, M.V. Estandarización del método de extracción del aceite esencial de las flores de Achillea millefolium (milenrama), encontrada en Belmira, Antioquia-Colombia, con aproximación a la cuantificación de β-Cariofileno por GC-FID por el método de adición estándar. Tesis de pregrado, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia, 2023.
15. Falconieri, D.; Piras, A.; Salgueiro, L. Chemical Composition and Biological Activity of the Volatile Extracts of Achillea millefolium. *Natural Product Communications* **2011**, *Volumen 6*, p.p. 1527-1530.
16. Yang, G; Wang, G; Li, X; Zhang, M. Study on new extraction technology and Chemical composition of litsea cubeba essential oil. *The Open Materials Science Journal* **2011**, *Volumen 5*.
17. Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. Cromatografía gaseosa. En *Fundamentos de cromatografía*. **2006**; p.p. 203-262.
18. Pérez, J.; Aguirre, L.; Pujol, M. Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. **2001**.
19. Skoog, D.A.; West, D.J.; Holler, F.O; Crouch, S.S. *Fundamentos de Química Analítica*, 9na edición; **2014**.
20. Quattrocchi, O.A.; Abelaira, S.; Laba, R.F. Análisis Cuantitativo. En *Introducción a la HPLC*. **1992** p.p. 301-329.
21. Gomis, V. Cromatografía: principios generales. Tesis de doctorado, Universidad de Alicante, San Vicente del Raspeig, España. **2008**.
22. Harris, D.C. Cromatografía de gases. En *Análisis Químico Cuantitativo,* 6ta edición; **2003**.
23. León, E.E. Desarrollo de un método de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para la separación y cuantificación de diosgenina en un extracto del fruto iguaraya de la planta cardón guajiro (Stenocereus griseus). *Avances en Química* **2023**, *Volumen 18*, pp. 55-59.
24. Rehab, A.H.; Amira, A.E. Plants Secondary Metabolites: The Key Drivers of the Pharmacological Actions of Medicinal Plants. In *Herbal Medicine*; Philip, F.B.; IntechOpen.
25. Teoh, E.S. Secondary Metabolites of Plants. *Medicinal Orchids of Asia* **2015;** pp. 59-73.
26. Aguirre, L.; García F.J; García, T.; Illera, M.; Juncadella, M.; Lindozo, M.; Lluch, A.M.; Martín, M.; Mateos, B.; Ochoa, C.; Ortega, M.A.; Pujol, M.; Reig, M.; Torres, M. Validación de métodos de análisis en materias primas y especialidades farmacéuticas. En *Validación de Métodos Analíticos.*; Asociación Española de Farmacéuticos en la Industria, **2001**; p.p. 56-65.
27. González, M.R.; Bermúdez, J.A.; Rivera, L.L.; Villarraga, E.J.; Guillén, C.A.; Ayala, J.G.; Gómez, R.M. Modelos de regresión lineal: Relación entre variables cuantitativas. En *Validación de Métodos Analíticos en Análisis Químico Cuantitativo.* Instituto Nacional de Metrología, **2023**; p.p. 27-35.
28. ICH Q2. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1).